Bull, Natl. Inst. Health Sci., **129**, 61-67（2011） **Original**

牛肉からの腸管出血性大腸菌 O111検出法の検討

廣井みどり[*1]，大塚佳代子[*2]，飯塚信二[*3]，多賀賢一郎[*4]，
杉山寛治[*1]，小西良子，工藤由起子[#]

Detection methods of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 in beef : A collaborative study

Midori Hiroi[*1], Kayoko Ohtsuka[*2], Shinji Iizuka[*3], Kenichiro Taga[*4],
Kanji Sugiyama[*1], Yoshiko Sugita-Konishi, Yukiko Hara-Kudo[#]

To establish a detection method for enterohemorrhagic *Escherichia coli*（EHEC）O111 in meat, a single-laboratory evaluation and a collaborative study were conducted focusing on comparisons of the efficiencies in combination with enrichment, a direct plating method and a plating method with immunomagnetic separation（IMS-plating method）using various agar media for EHEC O111, loop-mediated isothermal amplification（LAMP）assay targeting the Verocytotoxin（VT）gene as a molecular detection method. On a single-laboratory evaluation, enrichment in modified EC at 36℃ was inferior to that in modified EC supplemented with novobiocin（NmEC）and mEC at 42℃ to isolate EHEC O111 by plating methods. On a collaborative study, there were no significant differences between combinations of enrichment in NmEC at 42℃-LAMP assay and enrichment in mEC at 42℃-LAMP assay. The combinations of enrichment in NmEC at 42℃-direct plating and enrichment in NmEC at 42℃-IMS-plating were superior to combinations of enrichment in mEC at 42℃-direct plating and enrichment in mEC at 42℃-IMS-plating（$p<0.05$）. There were no significant differences among the six different agar media by the direct plating and IMS-plating methods. As a result, it was suggested that the following methods are adequate for detection of EHEC O111 in beef : combinations of enrichment in NmEC at 42℃, and direct plating and IMS-plating methods, or LAMP assay as a screening assay to detect VT gene followed by direct plating and IMS-plating methods.

Keywords : enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111, beef, LAMP assay, direct plating method, IMS-plating method

1．はじめに

平成23年４月に富山県等において焼肉チェーン店でユッケ等を食して発生した腸管出血性大腸菌O111（EHEC O111）による食中毒事件では，５月27日16時現在，有症者169人，そのうち４人が死亡する大きな被害がみられた[1)]．腸管出血性大腸菌の主な病原因子であるベロ毒素（VT）の産生またベロ毒素遺伝子の保有が本菌の重要な特徴であり，また本菌には多数の血清型があることが報告されている[2)]．国立感染症研究所病原微生物検出情報によると，我が国で腸管出血性大腸菌による食中毒を含めた感染症患者の主な血清群は，O157およびO26であるが，O111も例年比較的多く[2)]，2010年は36例が報告されている．2011年５月の時点で，厚生労働省が示している食品からの腸管出血性大腸菌の検出法は，血清群 O157およびO26のみであり[3)]，食中毒調査や汚染実態調査等において，食品からのEHEC O111の検出法，特に食肉を対象とした方法について多機関での検討を行い適切な方法を示すことが必要とされた．また，適

[#] To whom correspondence should be addressed :
Yukiko Hara-Kudo ; Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan ; Tel & Fax : ＋81-3-3-3700-9497 ; E-mail : ykudo@nihs.go.jp
[*1] Shizuoka Institute of Environment and Hygiene
[*2] Saitama Institute of Public Health
[*3] Yokohama Quarantine Station, Center for Inspection of Imported Foods & Infectious Diseases, Yokohama
[*4] Kobe Quarantine Station, Center for Inspection of Imported Foods & Infectious Diseases, Kobe

切な方法を確立することによって，食中毒での原因食品の究明や汚染食品の解明などが効果的に行われるものと考えられる．

近年，EHEC O111に適した新たな分離培地の開発など試験技術の発展が報告されていることから，これらを含め，EHEC O111の検出法について，増菌培養法および分離培養法の検討を早急に行うことが求められた．本研究では，対象食品をユッケ等に使用される牛肉とし，増菌培養法，分離培養法および遺伝子検査法について，単一機関での評価を行った後に多機関評価を行った．

2．方　法

2－1　単一機関での評価

菌株：EHEC O111　2株（菌株番号ESC4：VT1型およびVT2型陽性，菌株番号富山110512：VT2型陽性）を試験に供した．

検体作製：市販牛肉（国産）を無菌的に細断し，25gずつストマッカー袋に分配した．各菌株をトリプトソイブイヨン（TSB：オキソイド）10mlにて36℃18時間培養後，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で10^{-7}希釈した．10^{-7}希釈菌液を接種菌液とし，0.2mlをストマッカー袋に分配した牛肉検体に接種した．ストマッカー袋の外から手で良く菌液と検体を馴染ませ，これを菌接種検体とした．また，接種菌数を確認するために，10^{-7}希釈菌液を0.2mlずつトリプトソイ寒天培地（TSA：オキソイド）10枚に塗沫し36±1℃で24時間培養してコロニー数を測定した．

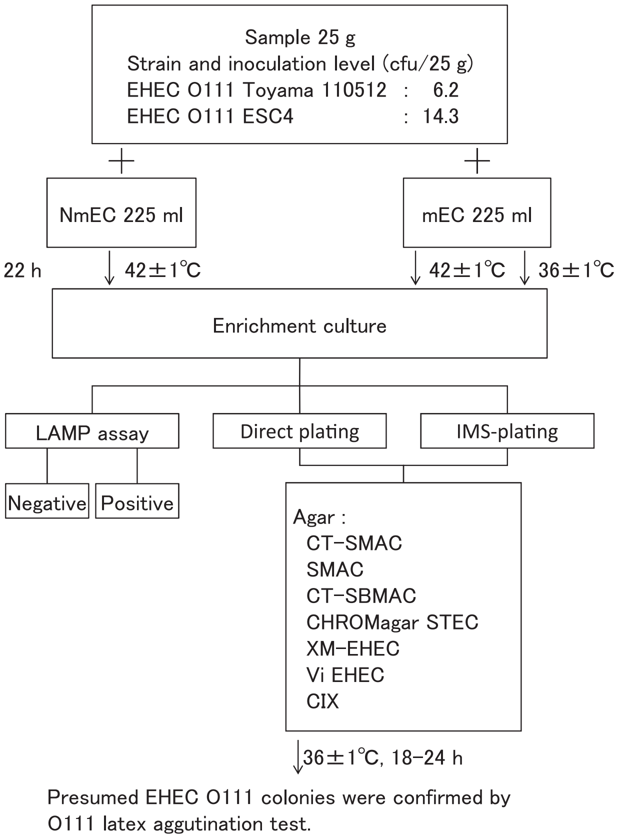

Fig. 1　Schematic overview of the detection of EHEC O111 in beef sample by plating methods and LAMP method on a single-laboratory evaluation.

増菌培養：各株ごとに2検体ずつに225mlのmodified EC培地（mEC培地：オキソイド）またはノボビオシン加mEC培地（NmEC培地：栄研化学）を加え，1分間のストマッカー処理を行った．mEC培地を加えた検体は42±1℃または36±1℃で，NmEC培地を加えた検体は42±1℃で22時間培養した．

Loop-mediated amplification（LAMP）法：増菌培養液から，アルカリ熱抽出法で調製したDNA抽出液を鋳型DNAとしてLoopamp腸管出血性大腸菌検出試薬キット（栄研化学）を用いて，ベロ毒素遺伝子を検出した．操作法はキットの取扱説明書に従った．また，リアルタイム濁度検出には，Loopampリアルタイム濁度測定装置（LA-320C：栄研化学）を用いた．

免疫磁気ビーズ法：免疫磁気ビーズO111「生研」（デンカ生研）を用い，取扱説明書に従い，1mlの増菌培養液を用いてEHEC O111の濃縮を行った．

塗抹法：増菌培養液10µlおよび免疫磁気ビーズ法による濃縮液20µlをソルビトールマッコンキー（SMAC）寒天培地（オキソイド），セフィキシム・亜テルル酸カリウム（CT）添加SMAC（CT-SMAC）寒天培地（オキソイド），CT添加ソルボースマッコンキー（CT-SBMAC）寒天培地（日水製薬および極東製薬工業），クロモアガーSTEC（関東化学），XM-EHEC寒天培地（日水製薬），Vi EHEC寒天培地（栄研化学）およびCIX寒天培地（極東製薬工業）に画線した．36±1℃にて18～24時間培養後，各寒天培地上に生育したコロニーのうち色調などの形態的特長からEHEC O111と思われるコロニーを最大数10コロニーまでを釣菌し，*E.coli* O111-F「生研」（デンカ生研）または病原大腸菌免疫血清O111（デンカ生研）を用いて，凝集反応を試験した．

2－2　多機関評価

参加機関：厚生労働省検疫所2機関および地方衛生研究所2機関の計4機関において検討した．

菌株：EHEC O111（菌株番号ESC 4）を用いた．

検体作製：VT遺伝子陰性であることが確認された市販牛肉（オーストラリア産）を無菌的に細断し，25gをストマッカー袋に量り採った．菌非接種，低菌数接種，高菌数接種の3種類の菌接種レベルの試料とするための検体を，各24検体作製し，乱数表を用いて無作為に検体番号を付与した．また，各機関でO111株を接種し陽性コ

ントロールとするための菌非接種検体（４検体）を作製した．接種菌液の作製のために，TSB10ml にて37℃で18時間培養した菌液を３ml および PBS27ml を50ml 容の三角フラスコに入れ，スターラーで１分間混和した．この混合液を10^{-7}まで10倍階段希釈し，さらにこれを２倍希釈した．これを接種菌液とし，低菌数用には0.1ml，高菌数用には0.5ml ずつ検体に接種した．袋の外から手で良く菌液と検体を馴染ませ，空気を抜いて上部をヒートシールし，これを菌接種検体とした．また，接種菌数を確認するために，接種菌液を TSA24枚に0.1ml ずつ塗抹し，36±１℃で24時間培養してコロニー数を測定した．作製した検体間に小型温度記録計を挟んでバイオセーフティー対応送付容器に入れ，冷蔵下で各機関へ送付した．

陽性検体は，各機関においてトリプトソイ斜面培地にて36±１℃にて18～20時間培養した EHEC O111（菌株番号 ESC４）のコロニーの一部を白金線にて生理食塩水１ml に浮遊し，これを生理食塩水にて10から100倍希釈した0.1ml を陽性用検体に接種して作製された（約10^3～10^4cfu/25g）．袋の外から手で良く菌液と検体を馴染ませ，これを上記検体と同様に mEC 培地225ml にて増菌培養した．また，実際の接種菌数の確認のため接種菌液をさらに100倍希釈し，その0.1ml を10枚の TSA 培地に塗抹した．培養後，生育したコロニー数から接種菌数を算出した．

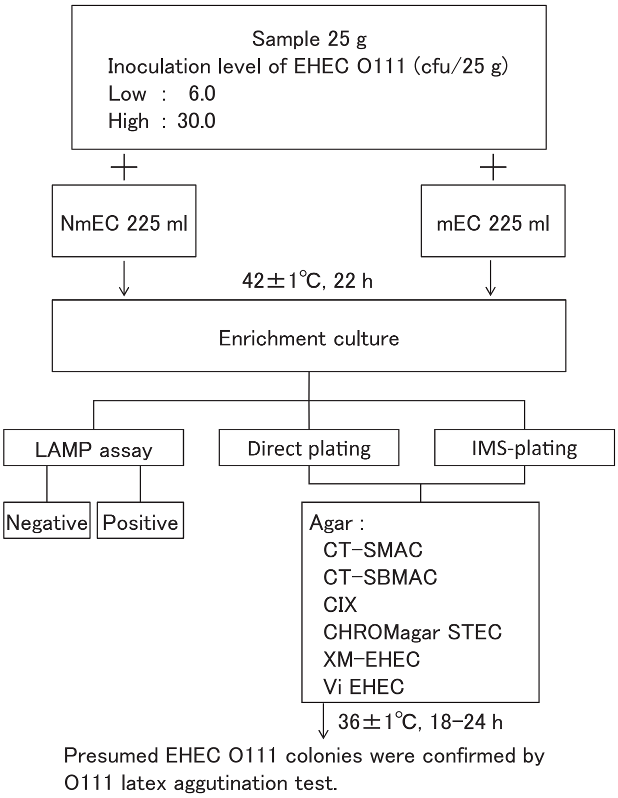

Fig. 2　Schematic overview of the detection of EHEC O111 in beef sample by plating methods and LAMP method on a collaborative study.

増菌培養：各菌数レベルの検体について，NmEC 培地および mEC 培地の各増菌培地について３検体ずつ225ml の増菌培地を加え，１分間のストマッカー処理を行い，42±１℃で22時間培養した．

LAMP 法，免疫磁気ビーズ法および塗抹法：単一機関評価と同様の手法によって，LAMP 法，免疫磁気ビーズ法および塗抹法を行った．寒天培地には，CT-SMAC 寒天培地，CT-SBMAC 寒天培地，CIX 寒天培地，クロモアガー STEC，XM-EHEC 寒天培地および Vi EHEC 寒天培地を使用し，各種培地につき２枚ずつに塗抹した．

統計解析：試験結果を集計し，検出方法別に感度及び特異性を算出した．その後，統計解析ソフト Stat View（ヒューリンクス）を用い，Student-Newman-Keuls 法による統計学的解析を行った．

３．結　果

３－１　単一機関評価

検体（25g）への接種菌数は，ESC４株が14.3cfu，富山110512株が6.2cfu であった．

LAMP 法における感度および特異性は３つの増菌方法のいずれの増菌培養によっても1.000（４/４）であった（Table１）．直接塗抹法では，感度は，42℃での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養では全７種類の寒天培地について1.000（４/４）であったが，36℃での mEC 培地による増菌培養では，EHEC O111が検出できない寒天培地が認められ，４検体すべての寒天培地から EHEC O111が検出されたのは CIX 寒天培地および CT-SMAC 寒天培地のみであった（Table１）．クロモアガー STEC，XM-EHEC 寒天培地および CT-SBMAC 寒天培地では，いずれの検体からも EHEC O111が検出されなかった．特異性は，いずれの増菌培養および寒天培地によっても1.000（４/４）であった．

免疫磁気ビーズ塗抹法では，感度は，42℃での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養では全種類の寒天培地について1.000（４/４）であったが（Table１），36℃での mEC 培地による増菌培養では，４検体すべての寒天培地から EHEC O111が検出されたのは CIX 寒天培地，SMAC 寒天培地および CT-SMAC 寒天培地のみであった．それ以外の寒天培地の感度は直接塗抹法より免疫磁気ビーズ塗抹法で検出率が高い結果であった．特異性は，いずれの増菌培養および寒天培地によっても1.000（４/４）であった．また，コロニー分離において CT-SBMAC 寒天培地は集落の鑑別が難しく O111と疑われるコロニーが多い傾向であった．

Table 1 Sensitivity and specificity of detection methods for EHEC O111[a] on a single-laboratory evaluation

Method	Sensitivity			Specificity		
	NmEC(42℃)[b]	mEC(42℃)	mEC(36℃)	NmEC(42℃)	mEC(42℃)	mEC(36℃)
LAMP assay	1.00(4/4)[c]	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)[d]	1.00(4/4)	1.00(4/4)
Direct plating						
CIX	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CHROMagar STEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.00(0/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
XM-EHEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.00(0/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
Vi-EHEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.25(1/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
SMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.75(3/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CT-SMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CT-SBMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.00(0/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
IMS-plating						
CIX	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CHROMagar STEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.50(2/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
XM-EHEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.75(3/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
Vi-EHEC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.50(2/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
SMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CT-SMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)
CT-SBMAC	1.00(4/4)	1.00(4/4)	0.75(3/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)	1.00(4/4)

[a] Inoculation level: Toyama110512 strain: 6.2 CFU/25g, ESC4 strain: 14.3 CFU/25g.
[b] Enrichment broth (temperature).
[c] Number of positive samples/number of samples inoculated with EHEC O111 (each strain was inoculated in two samples).
[d] Number of negative samples/number of samples uninoculated with EHEC O111.

Table 2 Sensitivity and specificity of detection methods for EHEC O111 on a collaborative study

Method	Sensitivity				Specificity	
	NmEC(42℃)[a]		mEC(42℃)		NmEC(42℃)	mEC(42℃)
	Low level[b]	High level[b]	Low level	High level		
LAMP assay	0.917(11/12)[c]	1.000(12/12)	0.917(11/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)[e]	1.000(12/12)
Direct plating						
CIX	0.917(11/12)[d]	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.750(9/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CHROMagar STEC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
XM-EHEC	0.833(10/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
Vi-EHEC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CT-SMAC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CT-SBMAC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.833(10/12)	0.750(9/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
IMS-plating						
CIX	0.917(11/12)[d]	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CHROMagar STEC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
XM-EHEC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.917(11/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
Vi-EHEC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.917(11/12)	0.917(11/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CT-SMAC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.833(10/12)	0.833(10/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)
CT-SBMAC	0.917(11/12)	1.000(12/12)	0.833(10/12)	0.750(9/12)	1.000(12/12)	1.000(12/12)

[a] Enrichment broth (temperature).
[b] Low level: 6.0 CFU/25g, high level: 30.0 CFU/25g.
[c] Number of positive samples/number of samples inoculated with EHEC O111.
[d] There were significant difference betwl agars at low and high inoculation levels.

3－2　多機関評価

検体（25g）への低菌数接種菌数は6.0cfu，高菌数接種菌数は30.0cfu であった．

検体の輸送時の温度は，梱包後に速やかに下がり，ほぼ0－5℃に保たれて配送された．到着後，梱包されたまま試験開始まで保管され，梱包から約24時間後に開梱し増菌培養された．培養開始後約2時間で検体は41.5℃に到達し増菌温度は41.5-42.5℃であった．また，陽性用検体への接種菌数は検体あたり約10^4cfu であった．陽性検体の結果は，いずれの機関においても，LAMP

Table 3　The numbers of non-*E.coli* O111 colonies with similar morphological characteristics to EHEC O111 on medium from samples uninoculated with EHEC O111

Enrichment[a]	Plating method	Medium					
		CIX	CHROMagar STEC	XM-EHEC	Vi EHEC	CT-SMAC	CT-SBMAC
NmEC	Direct plating	25[b]	6	6	13	25	24
	IMS-plating	30	12	14	22	33	24
mEC	Direct plating	25	18	7	12	31	24
	IMS-plating	28	12	2	12	24	18

[a] Enriched at 42℃.
[b] The numbers of non-E.coli O111 colonies but suspected as EHEC O111.

法，直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法において陽性であった．

LAMP 法における感度は，低菌数接種検体での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養は0.917（11/12）であったが，高菌数接種検体での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養は1.000（12/12）であった（Table 2）．また，特異性は NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養において1.000（12/12）であった．

直接塗抹法において，感度は高菌数接種検体での NmEC 培地による増菌培養ではすべての寒天培地について1.000（12/12）であったが，低菌数接種検体での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養では，0.833（10/12）から0.917（11/12）を示した（Table 2）．また，LAMP 法によってベロ毒素遺伝子が検出された検体でも，寒天培地の種類によって陰性となるものが認められた．高菌数接種検体での mEC 培地による増菌培養では，最も感度が低かったのは CIX 寒天培地と CT-SBMAC 寒天培地の0.750（9/12）であり，それ以外の寒天培地は0.833（10/12）であった．また，特異性は NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養において1.000（12/12）であった．

免疫磁気ビーズ塗抹法において，低菌数接種検体での NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養では，0.833（10/12）から0.917（11/12）を示した．高菌数接種検体では NmEC 培地による増菌培養における感度は直接塗抹法と同様にすべての寒天培地について1.000（12/12）であった（Table 2）．一方，mEC 培地による増菌培養では，最も感度が低かったのは CT-SBMAC 寒天培地の0.750（9/12）であり，それ以外の培地は0.750（9/12）から0.917（11/12）であった．特異性は NmEC 培地および mEC 培地による増菌培養において1.000（12/12）であった．

Student-Newman-Keuls 法による統計学的解析を低菌数および高菌数接種検体での結果を総合して行ったところ，NmEC 培地および mEC 培地の培地の違いによる検出率の比較では，LAMP 法において増菌培地の種類による検出結果に有意差はなかったが，直接塗抹法（寒天培地全種での結果を総合）および免疫磁気ビーズ塗抹法（寒天培地全種での結果を総合）においては mEC 培地より NmEC 培地での増菌培養法が有意に高かった（$p < 0.05$）（Table 2）．また，LAMP 法，直接塗抹法（寒天培地全種での結果を総合）および免疫磁気ビーズ塗抹法（寒天培地全種での結果を総合）での検出結果の比較では，いずれの増菌培地を使用した場合にも有意差はなかった．さらに，寒天培地の種類による検出結果の比較では，増菌培地および塗抹法のいずれの組み合わせにおいても有意差はなかった．

非接種検体での EHEC O111と疑われたが O111の凝集試験で否定されたコロニーの数については（Table 3），NmEC 増菌培養後の直接塗抹法による分離時はクロモアガー STEC および XM-EHEC 寒天培地が同数で最も少なく，NmEC 増菌培養後の免疫磁気ビーズ塗抹法による分離時はクロモアガー STEC が最も少なかったが，mEC 増菌培養後の直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法による分離時は，XM-EHEC 寒天培地が最も少なかった．寒天培地ごとに合計すると，XM-EHEC 寒天培地が最も少なく，次いでクロモアガー STEC，Vi EHEC，CT-SBMAC 寒天培地，CIX 寒天培地，CT-SMAC 寒天培地の順であった．

4．考察

単一機関評価では，特異性は LAMP 法，直接塗抹法および免疫磁気ビーズ法において，いずれの増菌培養および寒天培地によっても1.000であったが，感度は，mEC 培地での36℃培養が mEC 培地および NmEC 培地での42℃培養よりも，直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法を用いた菌の分離において劣っていた．一方，遺伝子検出法のひとつである LAMP 法ではいずれの増菌培養法においても感度は1.000（100%）であったことから，増菌培養液中に EHEC O111は増殖していた可能性が考えられた．Blais ら[4]によって，NmEC 培地では37℃よりも42℃での培養が牛ひき肉の菌叢を抑制し，大腸菌 O157：H7を良好に増殖させることが報告されてお

り，本研究でも，42℃培養によって競合する細菌の発育が抑制され，EHEC O111の寒天培地上での発育が阻害されにくかったため，鑑別が容易になった可能性が考えられた．また，EHEC O111は，亜テルル酸に対して耐性であることが報告されており[5]，今回もCT-SBMAC寒天培地およびCT-SMAC寒天培地から検出可能であった．今回mEC培地での36℃培養では，クロモアガーSTEC，XM-EHEC寒天培地，Vi EHEC寒天培地，SMAC寒天培地およびCT-SBMAC寒天培地において，直接塗抹法で検出できた検体数よりも，免疫磁気ビーズ塗抹法で検出できた検体数が増加し，免疫磁気ビーズ塗抹法による検出率の上昇の効果が認められた（Table 1）．Fratamicoら[6]はEHEC O111の検出法の検討において，直接塗抹法による検出率が市販の免疫磁気ビーズを用いた塗抹法による検出率を上回り，免疫磁気ビーズの親和力の低さを示唆する報告を行っているが，今回我々はFratamicoらの用いた免疫磁気ビーズとは異なる製造会社の製品を使用しており，上記のような現象は確認されなかった．

以上のことから，牛肉からのEHEC O111の検出にはmEC培地による36℃培養は適さず，NmEC培地およびmEC培地での42℃増菌培養が適していることが確認された．また，免疫磁気ビーズを用いると検出率が向上する傾向が認められた．

多機関評価は，単一機関だけでは得られない，機関ごとの機材や手法などの詳細の差異を含めた評価が得られることから評価結果の信頼性が高い．本研究では4機関ではあったが多機関評価を行った．その結果，NmEC培地での42℃増菌培養によって，LAMP法での感度が低菌数で0.917，高菌数で1.000であった．遺伝子検査法によるNmEC増菌培地からのベロ毒素遺伝子の検出は，牛ひき肉およびアルファルファからEHEC O157およびEHEC O26を分離する際に効果的な方法である[7]と報告されているが，EHEC O111の分離にも有用であることが確認された．また，直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法でのEHEC O111分離結果は，いずれの寒天培地においてもLAMP法のVT遺伝子検出結果とほぼ一致していたが，低菌数接種検体において直接塗抹法で分離できない寒天培地が1種類認められたため，EHEC O111の分離には2種類以上の寒天培地を用いることが必要と考えられた．さらに，NmEC培地での増菌培養では，高菌数接種検体での検出率は低菌数接種検体よりも高い傾向であったが，mEC培地での増菌培養では，逆に低菌数接種検体での検出率は高菌数接種検体よりも高い傾向であった．これはmEC培地中にEHEC O111以外の多数の細菌が増殖し，分離培地上での生育時にEHEC O111に競合し生育を阻害した可能性が考えられ，高菌数接種と低菌数接種の差が大きくなかったのではないかと思われる．Auvrayら[8]は，EHEC O111を含むEHECの分離において免疫磁気ビーズ塗抹法で除去できない競合菌があることから選択性の優れる分離培地の必要性を示していたが，EHEC O111分離のために近年に改良された各種寒天培地上でも免疫磁気ビーズ塗抹法を行ってもEHEC O111に類似するコロニーが生育することが今回の検討によって判明した．このことから，増菌培地からのベロ毒素遺伝子検出によってスクリーニングを行った後に直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法を行うことによって，EHEC O111の分離が省力化されると考えられた．加えて，塗抹法によるEHEC O111の分離において，42℃でのNmEC培地での増菌培養はmEC培地での増菌培養よりも有意に優れていることが認められた．42℃での増菌培養がEHEC O111以外の微生物の増殖を抑制し，偽陰性を減少させることはDrysdaleら[9]が報告しているが，NmEC培地での42℃増菌培養法は，mEC培地での42℃増菌培養法よりもさらにノボビオシンによって増菌培地中の競合する細菌の増殖を抑制することによって，寒天培地上の競合する細菌の数を減少させEHEC O111の検出率を上げたと考えられる．しかし，Kankiら[10]の報告によると，O157以外のEHECについてカイワレ大根からの検出や冷凍によって損傷した菌の検出の場合にはNmEC培地での42℃増菌培養法は，modified TSBやuniversal pre-enrichment brothでの増菌に比べて劣るとされていることから，牛肉以外の食品や冷凍による損傷菌が存在することが予想される検体では，さらに検討が必要と考えられる．

多機関で比較検討されたEHEC O111の検出方法はこれまでに報告がなかったため，食中毒事例での原因食品究明や汚染流通食品の解明には，各機関が妥当と考える方法によって検出が行われていたが，本研究で得られた有効な検出方法を使用して究明や解明が行われることによって機関ごとの結果が比較できることが考えられる．それによって食中毒の拡大や発生の防止が迅速に行われることが期待される．

本研究の結果から，牛肉からEHEC O111を検出する場合においては，NmEC培地での42℃培養を行い，O111選択分離用寒天培地を用いた直接塗抹法および免疫磁気ビーズ塗抹法によって菌分離を行うか，あるいはベロ毒素遺伝子を標的とした遺伝子検出で陽性となった菌培養液検体について上記の菌分離培養方法で菌分離を行うことが妥当と考えられた．

謝　辞

本研究は厚生労働省食品等試験検査費の助成を受けて実施された．

参考文献

1）飲食チェーン店での腸管出血性大腸菌食中毒の発生について（第15報），厚生労働省プレスリリース（http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001dpi2-att/2r9852000001dpm2.pdf）
2）Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute Infectious Diseases, Symptoms associated with EHEC infection, by serotype, 2010, Infect. Agents Surv. Rep., **32**, 127（2011）
3）腸管出血性大腸菌 O157及び O26の検査法について，食安監発第1102004号，平成18年11月2日
4）Blais, B. W., Booth, R. A., Phillippe, L. M. and Yamazaki, H.: *J. Food Microbiol.*, **36**, 221-225（1997）
5）Orth, D., Grif, K., Dierich, M. P. and Würzner, R.: *J. Res. Microbiol.*, **158**, 105-111（2007）
6）Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Cray, W. C. Jr., Narang, N., Yan, X., Medina, M. and Liu, Y.: *Foodborne Pathog. Dis.*, **8**, 601-607（2011）
7）Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Konuma, H. and Takatori, K.: *Int. J. Food Microbiol.*, **122**, 156-161（2008）
8）Auvray, F., Lecureuil, C., Taché, J., Leclerc, V., Deperrois, V. and Lombard, B.: *Lett. Appl. Micro biol.*, **45**, 646-651（2007）
9）Drysdale, M., MacRae, M., Strachan, N. J. C., Reid, T. M. S. and Ogden, I. D.: *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 220-224（1997）
10）Kanki, M., Seto, K., Harada, T., Yonogi, S. and Kumeda, Y.: *Lett. Appl. Microbiol.* **53**, 167-173（2011）